



Revista Médica de Trujillo

Publicación oficial de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo - Perú

Artículo Original

Efecto antibacteriano *in vitro* entre *Sonchus oleraceus* y Ceftazidima contra *Pseudomonas aeruginosa*

In vitro antibacterial effect between *Sonchus oleraceus* and Ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*

Elva Manuela Mejía Delgado¹, Aron Carmelo Aredo Tisnado², César Augusto Gabriel Argomede Alquizar², Wilson Steven Araujo Alvarado², Jhosley Marilid Aranda Ulloa², Joselyn Pamela Cabanillas Olivares², Deborah Ximena Arzani Lezcano², Rebeca Giuliana Alva Ugas², Jimmy Leonardo Abanto Rodriguez², Robinson Azabache Valera², Leonardo Albitres-Flores^{2,3}

1.Docente del Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo - UNT - Trujillo, Perú. 2.Estudiantes de Pregrado, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo – UNT – Trujillo, Perú. 3.Miembro de la Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Correspondencia Aredo Tisnado
Aron Carmelo

Teléfono: 973059226 E-
mail: aredo1997@gmail.com .

Recibido: 13/08/18

Aceptado: 17/09/18

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* entre *Sonchus oleraceus* y Ceftazidima contra *Pseudomonas aeruginosa*. **Material y Método:** Estudio experimental con post-prueba única y grupo control. Se aplicó el método de dilución en tubos para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *S. oleraceus* contra *P. aeruginosa*, luego mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer se determinó el efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa*, los grupos experimentales fueron cultivos de *P. aeruginosa* que tenían discos con la CMI, 50, 100, 500 y 1000 mg/mL del extracto etanólico de *S. oleraceus* mezclados con Ceftazidima, y el grupo control tuvo discos solo con Ceftazidima. **Resultados:** La CMI del extracto etanólico de *Sonchus oleraceus* contra *P. aeruginosa* fue de 25 mg/mL. El efecto antibacteriano entre la CMI de *S. oleraceus* y Ceftazidima fue menor que el efecto observado en el control ($p=0,003$). Por otro lado, se obtuvo que el efecto antibacteriano a 50 mg/mL y 100 mg/mL del extracto de *S. oleraceus* y Ceftazidima fue igual ($p=0,119$) y mayor ($p=0,018$) que el observado en el control respectivamente, sin embargo el efecto observado cuando se utilizó 500 mg/mL y 1000 mg/mL del extracto y Ceftazidima fueron menores al control ($p=0,529$ y $p=0,423$ respectivamente). **Conclusión:** El efecto antibacteriano *in vitro* entre *S. oleraceus* y Ceftazidima contra *P. aeruginosa* es mayor en bajas concentraciones y menor en elevadas concentraciones.

Palabras clave: *Sonchus*, Ceftazidima, *Pseudomonas aeruginosa*. (BIREME)

ABSTRACT:

Objective: Evaluate the *in vitro* antibacterial effect between *Sonchus oleraceus* and Ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*. **Material and Method:** Experimental study with only post-test and control group. The dilution method was applied in tubes to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the *S. oleraceus* ethanolic extract against *P. aeruginosa*. Then the antibacterial effect of the experimental groups against *P. aeruginosa* was determined with the Kirby-Bauer disc diffusion method, the experimental groups were cultures of *P. aeruginosa* which had disks with MIC, 50, 100, 500 and 1000 mg / mL of ethanolic extract of *S. oleraceus* mixed with Ceftazidime, and only ceftazidime was used in the control group. **Results:** The MIC of the ethanolic extract of *Sonchus oleraceus* against *P. aeruginosa* was 25 mg / mL. The antibacterial effect between CMI of *S. oleraceus* and Ceftazidime was lower than the effect observed in the control ($p = 0,003$). On the other hand, the antibacterial effect at 50 mg / mL and 100 mg / mL of the extract of *S. oleraceus* and Ceftazidime was equal ($p = 0,119$) and higher ($p = 0,018$) than the one observed in the control respectively. However, when it was used 500 mg / mL and 1000 mg / mL of the extract and Ceftazidime the effect observed were lower than the control ($p = 0,529$ and $p = 0,423$ respectively). **Conclusion:** The *in vitro* antibacterial effect between *Sonchus oleraceus* and Ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* is higher at low concentrations and lower at high concentrations.

Key words: *Sonchus*, Ceftazidime, *Pseudomonas aeruginosa*. (BIREME)

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo ubicuo que tiene la capacidad de adaptarse a distintos ambientes. Su diversidad metabólica y capacidad de formar biofilms cumplen un papel importante en la patogénesis de dicha bacteria convirtiéndola en un notable patógeno oportunista.^{1,2} Debido a su capacidad de persistir en dispositivos médicos y en el huésped se le ha asociado con al menos 65% de todas las infecciones clínicas humanas como septicemias en pacientes neutropénicos, infecciones pulmonares crónicas, fibrosis quística, endocarditis en adictos a la heroína, dermatitis en personas que usan baños calientes, otitis externa en diabéticos ancianos, entre otras.³⁻⁵ A su vez, la formación de biofilms conduce a la resistencia a múltiples fármacos siendo 10 a 1000 veces mayor en comparación con las bacterias planctónicas.²

Se ha planteado el uso de Ceftazidima como parte del tratamiento inicial de infecciones por *P. aeruginosa*⁶ por estar asociado con un menor riesgo de resistencia intratratamiento en monoterapia,⁷ sin embargo la prevalencia de cepas multiresistentes en numerosas UCI justifica el hecho de añadir otros antibióticos en combinación como Gentamicina o Tobramicina como tratamiento de elección⁸ con el fin de ampliar el espectro empírico inicial frente al riesgo de complicaciones intrahospitalarias.⁹

P. aeruginosa continúa siendo tema de estudio y análisis, por su importancia clínica, prevalencia en infecciones nosocomiales y por la múltiple resistencia a los antibióticos.⁴ Ello condujo a la búsqueda de enfoques alternativos de tratamiento como los productos de origen natural, siendo de interés el uso de plantas y sus componentes con propiedades antimicrobianas.¹⁰⁻¹² Dentro de las plantas que

contienen compuestos antimicrobianos bioactivos se encuentra el género *Sonchus* el cual incluye más de 50 especies donde destaca *S. oleraceus* por encontrarse ampliamente distribuida en todo el mundo a pesar de ser oriunda de Europa y Asia central.^{13,14}

Esta especie conocida en nuestro medio comúnmente como "Cerraja", posee alto contenido de lactonas sesquiterpénicas de la clase eudesmanolide y guaianolide así como esteroides, fenilpropanoides y compuestos fenólicos como flavonoides y cumarinas,¹³ siendo estos últimos compuestos los que desempeñarían la actividad antibacteriana contra Gram-positivos y Gram-negativos.¹⁵ El espectro antibacteriano de *S. oleraceus* es amplio y estudios describen su efecto contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *N. gonorrhoeae*, *V. parahaemolyticus*, *S. entérica*, *S. aureus* meticilino resistente, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* entre otras.^{13,15,16} Sin embargo, se ha reportado que los compuestos antibacterianos hechos a base de extractos de hojas *S. oleraceus* tienen mayor efecto sobre las bacterias Gram-negativas.¹⁷ Hallazgos obtenidos por Jimoh et al. demostraron la actividad antibacteriana del extracto acetónico y metanólico de *S. oleraceus* contra *P. aeruginosa* a diferencia de *S. asper*.¹⁸ También, se ha reportado la actividad antibacteriana de distintas especies de plantas entre ellas *S. oleraceus*, sosteniendo que esta especie tiene actividad anti-quorum sensing en *P. aeruginosa*.^{16,17}

Es así que, debido a la importancia de *P. aeruginosa* como agente causante de enfermedades nosocomiales graves, al fracaso de los antibióticos existentes para controlar las infecciones y al uso necesario de una terapia combinada para prevenir la resistencia de este patógeno, hace que sea crucial encontrar alternativas a los fármacos actualmente

disponibles.¹⁹ Por ello se propone el uso de *S. oleraceus* como alternativa natural a los regímenes establecidos, ya que, si bien se cuenta con información acerca de su actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*, se desconoce si la interacción con otros fármacos activos contra *P. aeruginosa* proporciona mejores resultados. Por este motivo, se realizó la presente investigación con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* entre *S. oleraceus* y Ceftazidima contra *P. aeruginosa*, para lo cual se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *S. oleraceus* contra *P. aeruginosa*, el efecto antibacteriano *in vitro* entre la CMI de *S. oleraceus* y Ceftazidima contra *P. aeruginosa* y la concentración de *S. oleraceus* con Ceftazidima con mayor efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa*.

MÉTODOS:

Se realizó un estudio experimental con post prueba única y grupo control. Se incluyó placas sembradas con *P. aeruginosa* que evidenciaban su crecimiento siguiendo las normas de bioseguridad del Manual de Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud del Perú; se excluyeron aquellas que mostraban contaminación. Se consideró las variables: efecto antibacteriano *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* como el diámetro de halo de inhibición y concentraciones del extracto etanólico de *S. oleraceus* y Ceftazidima como la mezcla de 25, 50, 100, 500 y 1000 mg/mL del extracto con 1mg/mL de Ceftazidima. Se calculó la cantidad mínima de 8 repeticiones de cada proceso experimental donde se tomó en cuenta $Z_{\alpha/2}=1,96$ $p' \alpha= 0,05$; $Z_{\beta/2}=0,84$ $p' \beta=0,20$ y $\sigma=0,7(X1 - X2)$ por no haber estudios previos en nuestro medio.

Se recolectó *S. oleraceus* "Cerraja" de la ciudad de Trujillo a 34 m.s.n.m., La Libertad, Perú,

durante el mes de octubre del año 2016; depositada en el herbario Truxillense de Trujillo (HUT), La Libertad, Perú con el código 58439. El espécimen vegetal se procesó en el laboratorio de farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Se obtuvo el material pulverizado de las hojas del espécimen y se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar de boca ancha. Se pesó 50 g del material pulverizado y se disolvió con etanol al 70%. El extracto se obtuvo por reflujo durante 120 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y luego se filtró al vacío para ser concentrados con un evaporador rotatorio a 40°C, liofilizados y almacenados en frascos color ámbar a 4°C. Se realizó el análisis fitoquímico cualitativo del extracto para identificar la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, terpenos, esteroides, cumarinas, lactonas y alcaloides. Se preparó la concentración madre de 1g/mL y se diluyó con alcohol de 70° para obtener las diferentes concentraciones del extracto.

La cepa de *P. aeruginosa* fue una cepa clínica obtenida del Hospital Regional Docente de Trujillo que se conserva en el laboratorio de microbiología y parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo, siendo sensible a Ceftazidima, Ciprofloxacino, Amikacina, Trimetropim e Imipenem y resistente a Carbenicilina de acuerdo al antibiograma realizado. Se preparó el inóculo con la cepa reactivada en caldo Muller-Hinton y se diluyó con solución salina fisiológica hasta obtener una turbidez similar al tubo N° 0,5 de McFarland el cual corresponde a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL.

Para determinar la CMI del extracto etanólico de *S. oleraceus* se utilizó el método de dilución en tubos. Las concentraciones se determinaron

mediante un ensayo piloto donde se observó actividad antibacteriana por el método de difusión en discos a partir de 50 mg/mL, estableciendo concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 500 mg/mL para determinar la CMI del extracto etanólico de *S. oleraceus*. Se preparó 5 tubos de ensayo con 0,2 mL del inóculo más 0,8 mL de cada concentración respectivamente, y un tubo de ensayo control con 0,8 mL de solución salina fisiológica más 0,2 mL del inóculo. Los tubos fueron incubados a 37°C por 24 horas para luego sembrar con 0,1 mL de solución de cada tubo en 10 placas con Agar Muller-Hinton, utilizando el asa de Driglasky para dispersar la muestra; dichas placas se colocaron a la estufa a 37°C por 24 horas, y luego se procedió a contar las UFC, considerando la CMI a la menor concentración del extracto en la cual no se observan UFC.

Para determinar el efecto antibacteriano entre *Sonchus oleraceus* y Ceftazidima se utilizó el método de difusión en disco o método de Kirby-Bauer. Se preparó discos de papel filtro Whatman N°4 de 6 mm de diámetro; se colocó 5 µL de Ceftazidima diluido a 1mg/mL con agua destilada (Grupo control) y 5 µL de la mezcla del extracto etanólico de *Sonchus oleraceus* a partir de 25, 50, 100, 500 y 1000 mg/mL con Ceftazidima a 1mg/mL (Grupos experimentales) los cuales se rotularon como G1, G2, G3, G4 y G5 respectivamente. Cada disco fue colocado en placas con agar Muller-Hinton previamente sembradas con el inóculo de *P. aeruginosa* mediante hisopado. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición de cada muestra con la ayuda de una regla milimetrada.

Los datos fueron recolectados y procesados en el programa SPSS versión 22,0 para Windows, se analizó los supuestos de distribución normal e igualdad de varianza de la información con

las pruebas estadísticas Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente, se realizó el análisis de varianza y la diferencia significativa mínima de Fisher para determinar las diferencias significativas entre cada grupo experimental considerándose estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$.

El Comité de Ética del Comité Permanente de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo evaluó y aprobó la realización del presente trabajo.

RESULTADOS:

El análisis fitoquímico de la planta demostró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, terpenos, esteroides, cumarinas, lactonas y descartó la presencia de alcaloides.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) contra cepa silvestre de *Pseudomonas aeruginosa* fue de 25 mg/mL del extracto etanólico de *Sonchus oleraceus*, no hubo UFC en las placas a partir de 25 mg/mL a diferencia del control con solución salina en el cual se cuantificó 1801 UFC en promedio.

Se demostró los supuestos de distribución normal con la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov con valores de $p > 0,05$ para cada grupo y la igualdad de varianzas con la prueba de Levene con valores de $p > 0,05$ para cada grupo.

Al analizar mediante el ANOVA los diámetros de los halos de inhibición de las mezclas del extracto etanólico de *Sonchus oleraceus* en las concentraciones de 25, 50, 100, 500 y 1000 mg/mL con Ceftazidima, se demostró que la media de al menos un grupo es significativamente diferente ($p < 0,01$) (Tabla 1), al realizar la prueba de diferencia significativa mínima (DSM) de Fisher se obtuvo que el promedio de los diámetros de los halos de

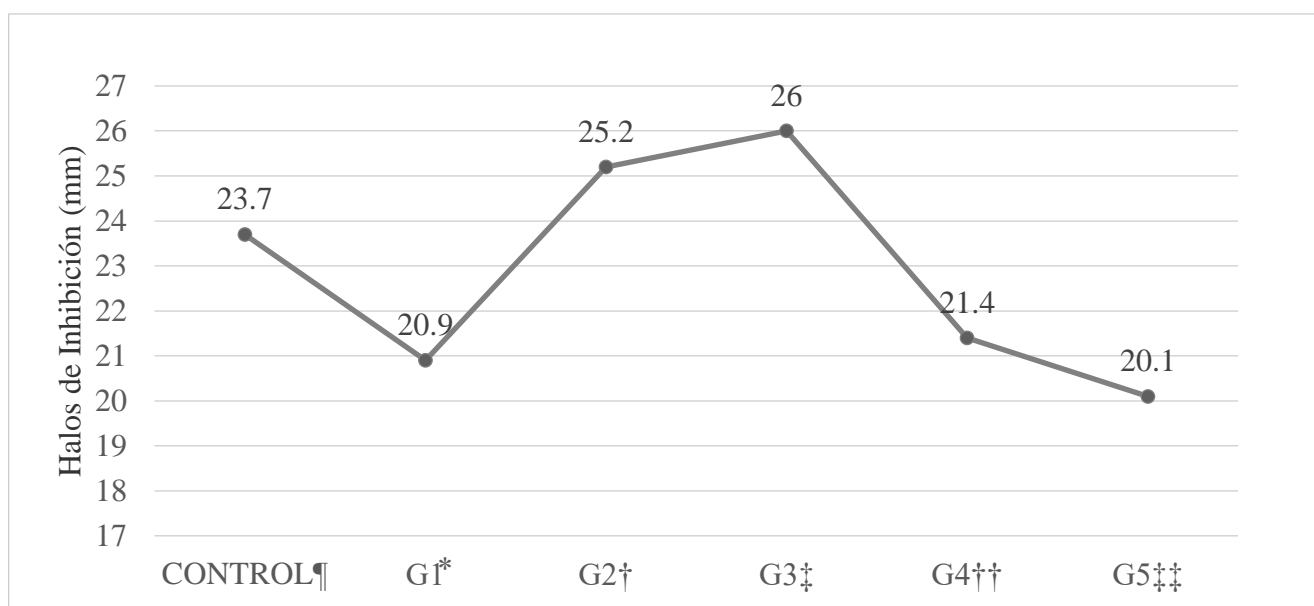
inhibición generado por G1 es significativamente menor al promedio generado por el grupo control ($p=0,003$), sin embargo son similares estadísticamente a los promedios de G4 ($p=0,529$) y G5 ($p=0,463$). Por otro lado, el diámetro promedio de G3 es

significativamente mayor que el grupo control ($p=0,018$), sin embargo no difiere significativamente de G2 ($p=0,402$) el cual tiene un diámetro promedio cuya diferencia no fue significativa con el grupo control ($p=0,119$). (Gráfica 1, Tabla 2)

Tabla 1. Análisis de Varianza de Grupos experimentales y Grupo control

	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p*
Entre grupos	327,086	54,514	12,114	0,000
Dentro de grupos	283,500	4,500		
Total	610,586			

*Significancia. Si $p < 0,05$ es significativo



Ceftazidima 1mg/mL * Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 25 mg/mL (CMI) † Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 50 mg/mL ‡ Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 100 mg/mL †† Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 500 mg/mL ‡‡ Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 1000mg/mL

Gráfica 1. Comparación de los halos de inhibición (mm) entre el grupo Control y los Grupos experimentales.

Tabla 2. Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher para los diámetros de inhibición producidos por la mezcla de 5 concentraciones del extracto etanólico de *Sonchus oleraceus* con Ceftazidima sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Factor	N	Media ± Desviación estándar	Categoría	
Control ¶	10	23,7 ± 2,00	I	
G1*	10	20,9 ± 2,13	II	
G2†	10	25,2 ± 2,49	I	III
G3‡	10	26 ± 2,49		III
G4††	10	21,4 ± 1,9	II	
G5‡‡	10	20,1 ± 1,79	II	

¶ Ceftazidima 1mg/mL

* Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 25 mg/mL

† Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 50 mg/mL

‡ Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 100 mg/mL

†† Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 500 mg/mL

‡‡ Ceftazidima 1mg/mL+ *Sonchus oleraceus* 1000mg/mL

DISCUSIÓN

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *S. oleraceus* contra *P. aeruginosa* determinada en la presente investigación es mayor a la obtenida por Jimoh et al. en donde el CMI fue de 2,5 mg/ml¹⁸ y por Reema Al-Hussaini et al. donde encontraron un CMI de 1,5 mg/ml.¹⁶

El efecto antibacteriano in vitro entre la CMI de *S. oleraceus* y Ceftazidima contra *P. aeruginosa* hallado fue menor respecto al efecto observado

en el control, dicho resultado probablemente esté relacionado con los discos de papel filtro Whatman empleados, los cuales están

compuestos de celulosa y proporcionan una superficie hidrofílica por contener grupos hidroxilo, estos interactúan directamente con algunos compuestos catiónicos presentes en *S. oleraceus* absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo su difusión en el agar.²⁰ Además, se obtuvo que el efecto antibacteriano a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL del extracto con Ceftazidima fue mayor que el control, lo que sugeriría un posible sinergismo.²¹ Se sabe que las plantas producen una enorme variedad de moléculas antibióticas pequeñas, generalmente clasificadas como "fitoalexinas" (terpenos, glicoesteroides, flavonoides y polifenoles),²² en el caso de *S. oleraceus* se le atribuye a compuestos fenólicos y flavonoides según el estudio realizado por Xia et al.¹⁵ y se ha encontrado que a mayor concentración de compuestos fenólicos oxidados mayor es el efecto inhibitorio. El mecanismo que se le atribuye a la toxicidad fenólica comprende la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente debido a una reacción con grupos sulfhídrido o a través de interacciones no específicas con proteínas.²³ En las pruebas fitoquímicas realizadas para la especie *S. oleraceus* de nuestro medio se encontraron estos componentes además de saponinas, terpenos, lactonas, cumarinas y esteroides.

Por otro lado, se obtuvo menor efecto antibacteriano a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL del extracto con Ceftazidima con respecto al control, sugiriendo así un posible antagonismo entre *S. oleraceus* y el fármaco empleado, sin embargo no se encontraron estudios previos en relación a lo obtenido. Una posible explicación del antagonismo observado en los grupos G4 y G5 es que alguno de los componentes de *S. oleraceus* pudiera haber actuado como un agonista parcial sobre las *penicillin-binding proteins* (PBPs), de modo que

dosis crecientes de *S. oleraceus* compitieron con Ceftazidima, produciéndose una inhibición de la respuesta antibacteriana y la consiguiente disminución en los diámetros de los halos de inhibición observados, hipótesis sustentada en la afinidad de los flavonoides por estas dianas²⁴ y en los efectos antagónicos debidos a dosis crecientes de agonistas parciales.²⁵ El presente estudio se realizó solo con los recursos disponibles en los laboratorios de la Universidad Nacional de Trujillo, sin embargo los procedimientos realizados son reproducibles y los resultados tienen validez para ser confirmados con mejores métodos.

Se concluye que la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *S. oleraceus* contra *P. aeruginosa* fue de 25mg/mL, el efecto antibacteriano *in vitro* entre la CMI de *Sonchus oleraceus* y Ceftazidima contra *P. aeruginosa* fue menor al efecto antibacteriano de Ceftazidima y que la concentración de *S. oleraceus* con Ceftazidima que presenta mayor efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa* fue de 100 mg/mL del extracto etanólico.

Se recomienda realizar el análisis cuantitativo de los componentes del extracto etanólico de *S. oleraceus*, evaluar la interacción entre el extracto etanólico de *S. oleraceus* con Ceftazidima haciendo uso del método de las curvas de letalidad o método de la tabla de ajedrez y evaluar el efecto antibacteriano de *S. oleraceus* y las posibles combinaciones con fármacos contra *P. aeruginosa* *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS:

Se agradece por su colaboración a Dra. Dra. Marilú Roxana Soto Vasquez y a nuestro compañero Luis Alberto Álvarez Vallejos.

CONFLICTOS DE INTERÉS: Los autores no declaran conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Teixeira P, Tacão M, Alves A, Henriques I. Antibiotic and metal resistance in a ST395 *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate: A genomics approach. *Mar Pollut Bull.* 2016;110 (1):75-81.
2. De la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Mansour S, Reckseidler-Zenteno S, Hernández D, Brackman G, et al. D-Enantiomeric Peptides that Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Chemistry & Biology.* 2015;22: 196-205.
3. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, HultgrenSJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013. 1;3(4): 1-23.
4. Andueza F, Albuja A, Arguelles P, Escobar S, Espinoza C, Araque J, et al. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas termales de la provincia del Chimborazo, Ecuador. *An Real Acad Farm.* 2015;81(2):158-63.
5. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284:1318–1322
6. Bisso A. Antibioticoterapia en las infecciones graves. *Acta Méd. Per.* 2011;28(1):27-38.
7. Hernández A, García E, Herrero J.A, Gómez J. Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* Y *Stenotrophomonas maltophilia*. *Medicine.* 2014; 11(56):3311-16.
8. Lim WS, BaudouinSV, George RC, Hill AT, Jamieson C, Le Jeune I, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax.* 2009;64 (Suppl III): iii1–iii55.
9. Luna CM., Monteverde A, Rodríguez A, Apezteguia C, Zabert G, Ilutovich S, et al. Neumonía intrahospitalaria: guía clínica aplicable a Latinoamérica preparada en común por diferentes especialistas. *Arch Bronconeumol.* 2005; 41(8):439-556.
10. Chu W, Zhou S, Jiang Y, Zhu W, Zhuang X, Fu J. Effect of traditional chinese herbal medicine with antiquorum sensing activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:1-7.
11. Khan RA, Khan MR, Sahreen S, Bokhari J. Antimicrobial and phytotoxic screening of various fractions of *Sonchus asper*. *Afr J Biotechnol.* 2010; 9(25): 3883-3887.
12. Rubio-Moraga A, Argandoña J, Mota B, Pérez J, Verde A, Fajardo J, et al. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum taxa* (*Cistaceae*) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J Ethnopharmacol.* 2013 Jun 21; 148(1): 287–96.
13. Elkhayat E. Cytotoxic and antibacterial constituents from the roots of *Sonchus oleraceus* L. growing in Egypt. *Pharmacogn mag* 2009; 5(20): 324-8
14. OuZQ, SchmiererDM, Rades T, Larsen L, McDowell A. Application of an online post-column derivatizationHPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts. *J Pharm Pharmacol.* 2013 Feb;65(2):271-9
15. Xia DZ, Yu XF, Zhu ZY, ZouZD. Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus spp.*) in China. *Nat Prod Res.* 2011; 25(20):1893–901.
16. Al-Hussaini R, Mahasneh AM. Antibacterial and antifungal activity of ethanol extract of different parts of medicinal plants in Jordan. *J Pharm Sci.* 2011; 4(1): 57-69.
17. Kazemian H, Ghafourian S, Heidari H, Amiri P, Kardan J, Shavalipour A, et al. Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(4):432-436.
18. Jimoh F, Adedapo A, Afolayan A. Comparison of the nutritive value, antioxidant and antibacterial activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. *Rec Nat Prod.* 2011; 5 (1): 29-42
19. Adonizio A, Leal M, Ausubel M, Mathee K. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by medicinal plants in a *Caenorhabditis elegans* model system. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57: 809–813.
20. Ramírez E, Marin D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica.* 2009; 15(42): 263-68.
21. Ulloa G, Aguilar M, De Lama M, Lizarzaburu J, Del Valle J. Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(11): 928–931.
22. Hemaiswarya S, Kruthiventi A, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; 15: 639–652.
23. Murphy M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(4): 564 - 82.
24. Cushnie T, Lamb A. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag.* 2011 Ago; 38(2):99 – 107.
25. Blumenthal D, Garrison J. Farmacodinámica: mecanismos moleculares de acción de los fármacos. In: Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12° ed. Buenos Aires: McGraw Hill Interamericana Editores SA; 2011. p. 41-71.

